

UNTERSUCHUNGEN ZUM AMINOSÄUREN- UND
PROTEINSTOFFWECHSEL WÄHREND DER AUTOGENEN
UND ANAUTOGENEN EIREIFUNG VON *CULEX PIPIENS*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
Universität Zürich

von
Hans Briegel

aus
Schaffhausen

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. S. CHEN
Zürich, 1969

PERGAMON PRESS
OXFORD LONDON NEW YORK PARIS
1969

Curriculum vitae

Hans Briegel, von Schaffhausen, wohnhaft in Zürich.—Am 16. September 1938 wurde ich in Wienacht (Kanton Appenzell ARh.) geboren, wo ich die Primarschule besuchte. Im Jahre 1952 zogen wir um nach Oerlikon. Im Herbst 1959 schloss ich an der Kantonschule Zürcher Oberland in Wetzikon mit der kantonalen Lehramtsmatur ab. Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. In meinem Zoologiestudium besuchte ich Vorlesungen und Kurse der Herren Professoren und Dozenten: K. Akert, R. Bachofen, J. Biegert, H. Burla, P. S. Chen, K. Daumer, E. Hadorn, H. Hediger, H. Kroeger, E. Kuhn-Schnyder, U. Leupold, F. Markgraf, P. Peisl, A. Rutishauser, H. Schmid, A. H. Schultz, E. Schumacher, G. Semenza, P. Tardent, G. Töndury, H. Ursprung, B. L. van der Waerden, H. Wanner, Ch. Weissmann.

Im Sommer 1964 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler mit Hauptfach Zoologie. Darauf begann ich mit den Arbeiten zur Dissertation, welche unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. S. Chen stand. Seit 1962 bin ich mit einem kurzen Unterbruch als Assistent am Zoologischen Institut der Universität Zürich tätig.



UNTERSUCHUNGEN ZUM AMINOSÄUREN- UND PROTEINSTOFFWECHSEL WÄHREND DER AUTOGENEN UND ANAUTOGENEN EIREIFUNG VON *CULEX PIPIENS*

HANS BRIEGEL

Zoologisch-Vergl. Anatomisches Institut der Universität Zürich

(Received 27 January 1969)

Abstract—Under the same larval dietary conditions newly emerged autogenous females of *Culex pipiens pipiens* L. are significantly heavier, have a distinctly higher total nitrogen content, and contain twice as much protein as anautogenous females of *Culex pipiens fatigans* Wiedem. After each gonotrophic cycle these values decline to a residual level which is the same in both types of mosquitoes (2.5 mg fresh weight, 50 μ g nitrogen and 0.1 mg protein per female). The residual values show a sharp increase of two to four times after each blood meal. This physiological periodicity has its morphological appearance in a parallel alteration of the volume of developing ovarian follicles.

The absolute protein content of mature ovaries shortly before oviposition is significantly lower after autogenous maturation (without a previous blood meal) than after anautogenous maturation (after a previous blood meal), whereas the relative protein content per unit wet weight of the ovary is the same in both. In anautogenous females the protein content of the whole body shortly before egg-laying is the same as that of their ovaries. In contrast, the body of autogenous females contains at this time only half as much protein as the ovaries. It is concluded that during the period of autogenous maturation yolk protein is synthesized at the expense of protein reserve carried over from the larval life.

Analyses of ovary hydrolysates demonstrated that the rate of deposition of yolk protein is different between the two types of egg maturation: autogenous females show the greatest increase of proteins in their ovaries between 48 and 72 hr after emergence, whereas in anautogenous females this takes place between 24 and 48 hr after a blood meal. During these periods there is also a maximal increase in the volume of ovarian follicles. The percentage distribution of amino acids in hydrolysates from ovaries at the resting stage differs distinctly between the two types of females but shows a remarkable similarity prior to oviposition.

In female adult mosquitoes the free amino acids decrease at the time of yolk synthesis and increase in the course of digestion of a blood meal. In general, alanine, glutamic acid, methionine sulfoxide, and histidine show the highest concentrations, amounting to 5 to 30 per cent of the total. With the exception of methionine sulfoxide and taurine, the pattern of free amino acids in the two types of females is similar.

Investigations of the content of the midgut at different intervals after a blood meal revealed that during the first day about 50 per cent of the ingested blood disappeared from the intestine. At 72 to 96 hr after a blood meal, i.e. at the time of oviposition, digestion is usually completed.

In the excreta after a blood meal uric acid contributes to about 30 per cent of the dry weight in both mosquito types. About 64 per cent of the total nitrogen excreted is present as uric acid, 16 per cent as amino nitrogen, and 20 per cent as unknown residues. Excretion of amino acids has also been analysed. During the first day after blood-feeding free histidine contributes to about 80 per cent of all free amino acids excreted. Hydrolysis of the excreta demonstrated that during the second day 60 per cent of all peptide or protein-bound amino acids excreted is represented by glycine. Histamine and taurine could not be detected. In general, the excretion of uric acid and amino acids reaches a maximum between 24 and 48 hr after blood ingestion, at the time when anautogenous synthesis of yolk protein is most intensive.

In anautogenous females of *C. p. fatigans* only two-thirds of all amino acids ingested with blood are utilized for egg production (42 eggs/mg blood). In autogenous females of *C. p. pipiens* the protein reserve carried over from the larval stage is only about half as much as the protein taken up from a blood meal, but apparently sufficient for the production of a first batch of eggs, which indeed is smaller than the subsequent ones. The present results are discussed in relation to the problem of autogeny in mosquitoes.

EINLEITUNG

STECHEMÜCKENWEIBCHEN, welche während des Adultlebens für die Ausbildung ihres ersten Eigeleges keine Nahrung aufzunehmen brauchen, werden autogen genannt. Anautogene Weibchen dagegen müssen vor jeder Eiablage mindestens einmal einen Wirt finden um Blut zu saugen. Unter den Culicinae sind bis heute einige autogene Rassen und Arten aus elf Gattungen bekannt geworden, die Mehrheit ist aber anautogen. Die Autogenie ist jedoch nicht nur auf diese Vertreter beschränkt, sondern findet sich auch bei anderen Nematoceren, beispielsweise bei den Chaoborinae (MÖLLRING, 1956).

Besonders verbreitet ist die Autogenie bei der Stechmücke *Culex pipiens* L. Über die Genetik dieses Merkmales wurde in den letzten Jahren intensiv gearbeitet; es sei auf die Zusammenstellung von LAVEN (1967) verwiesen. Demnach beruht das Phänomen 'Autogenie' auf zwei Genen, wovon eines mit mehreren Allelen im dritten Chromosom und das andere im ersten Chromosom lokalisiert ist (KHAN, 1963; LAVEN, 1967).

Früher wurde dieser physiologisch bedeutende Unterschied von adulten Weibchen zunächst auf die Larvenernährung zurückgeführt. Auf Grund verschiedener Arbeiten zeigte sich jedoch, dass die Larvalernährung nur die Zahl der abgelegten Eier beeinflusst, nicht aber die autogene Reifung an sich (WEYER, 1934). Neuere Arbeiten ergaben deutlich, dass hormonale Mechanismen die Unterschiede zwischen autogener und anautogener Eireifung bei der Gattung *Culex* und *Aedes* bewirken (CLEMENTS, 1956; LEA, 1963); dabei sind nicht nur die Corpora allata massgeblich verantwortlich, sondern auch die medialen neurosekretorischen Zellen des Protocerebrums (LEA, 1967). Die Autogenie kann in ihrer Expressivität durch die Larvalernährung modifiziert werden (LEA, 1964); wahrscheinlich ist diese Expressivität auch von Fall zu Fall verschieden labil (LEA, 1964), was mit den genetischen Befunden in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Nachweislich verfügen nun die frischgeschlüpften, autogenen Weibchen bei gleicher Larvenernährung über mehr Reservestoffe im Fettkörper als die anautogenen (MÖLLRING, 1956). Für die Dotterbildung sind jedoch die Proteine von grösster Wichtigkeit (CHEN, 1959; ROTH und PORTER, 1964), was auch daraus hervorgeht, dass rund 90 Prozent vom Trockengewicht des aufzunehmenden Wirtsblutes aus Proteinen bestehen (BURSELL, 1965). Zucker ist für die Eireifung nicht essentiell und wird allgemein von Insekten in Fett umgewandelt als Energiereserve (GILMOUR, 1965); bei *Aedes aegypti*-Weibchen wird Glucose zur Triglyceridsynthese verwendet (VAN HANDEL und LUM, 1961). Die im Blute aufgenommenen Lipide sind bei *Aedes* für die Eiproduktion ebenfalls entbehrlich (LEA *et al.*, 1956), und die Vitamine wirken auf die Eireifung wahrscheinlich nur modifikatorisch (LEA *et al.*, 1958).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Vorgänge im Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel während autogener und anautogener Eireifung bei Mückenweibchen der Gattung *Culex* einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Es werden vor allem der Stickstoffgehalt, die Aminosäuren, die Blutaufnahme, Verdauung, Exkretion und die Ovarreifung zwischen autogenen und anautogenen Weibchen nächster systematischer Verwandtschaft verglichen. Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zu den stoffwechselphysiologischen Problemen der Autogenie leisten.

MATERIAL UND METHODE

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stechmücken gehören innerhalb der Gattung *Culex* zum *pipiens*-Komplex, dessen taxonomische Verhältnisse noch nicht abgeklärt sind (MATTINGLY *et al.*, 1951; LAVEN, 1967). Wir halten uns an die Nomenklatur von LAVEN (1957, 1967) und STONE *et al.* (1959). Danach handelt es sich bei den im Institut seit 1956 unter Inzucht gehaltenen Mücken um (1) *Culex pipiens pipiens* L., welche aus dem autogenen Stamm 'Paris' (LAVEN, 1957) abgezweigt wurden, und (2) um die anautogenen *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, welche aus dem Stamm 'Bakersfield' (LAVEN, 1957) herkommen.

Die Zucht erfolgt bei 25°C und 60–70 Prozent relativer Feuchtigkeit; nähere Beschreibungen finden sich bei CHEN (1958) und CHEN und BRIEGEL (1965). Um das Alter der Versuchstiere zu kennen, wurden die Weibchen innerhalb 2 Stunden nach dem Schlüpfen gesammelt und zu zweit in Gläsern mit Wasser bei 25°C gehalten. Für die Untersuchung nach Blutmahl wurden zunächst Weibchen beliebigen Alters im Zuchtkäfig (50 × 50 × 50 cm) verwendet, indem wir 2–10-wöchige Kücken jeweils für etwa 3 Stunden exponierten; anschliessend entnahmen wir Weibchen, welche mit Blut vollgesogen waren und brachten diese ebenfalls in separate Gläser. Diese Tiere wurden nun wieder als gleichaltrig behandelt.

Die meisten Untersuchungen wurden nach 24-stündigen Intervallen vorgenommen, wobei die einzelnen Zeitpunkte um rund 2 Stunden variieren konnten. Die Eiablage erfolgte bei unseren Bedingungen meist zwischen 72 und 96 Stunden nach dem Schlüpfen (autogen) resp. nach dem Blutmahl (anautogen). Alle zu Messungen benützten Weibchen lebten im natürlichen Tag–Nacht-Rhythmus.

Um zu den gewählten Zeitpunkten der Versuche die Entwicklungsstadien der Ovarien zu kennen, wurden histologische Schnitte angefertigt und das Wachstum einzelner Follikel ausgemessen. In Abb. 1 sind die Stadien veranschaulicht und mit der nach Christophers üblichen Bezeichnung (CLEMENTS, 1963) versehen worden. Die Dauer der einzelnen Stadien ist unter diesen Umständen verschieden, aber die Entwicklungszeiten bis zum reifen Ei sind bei diesen Mücken gleich.

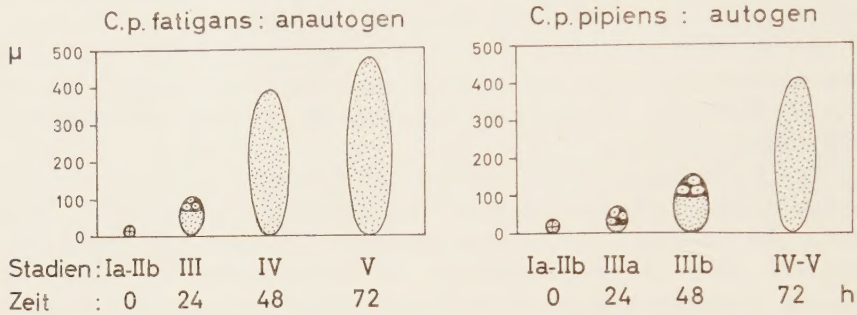


ABB. 1. Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von Eifollikeln im Ovar autogener und anautogener *C. pipiens*-Weibchen. Ordinate: Follikellänge in µ; Abszisse: Stadien nach Christophers und Zeit in Stunden nach Schlüpfen (*C. p. pipiens*) resp. nach Blutaufnahme (*C. p. fatigans*).

Zuerst wurde bei allen zur Untersuchung gelangenden Tieren das Frischgewicht bestimmt. Die Ermittlung des Total-Stickstoffgehaltes erfolgte nach der Mikro-Kjeldahlmethode von BOELL und SHEN (1954), wozu 1 Weibchen pro Messung genügte. Der Proteingehalt wurde nach dem Biuret-Verfahren bestimmt; für jede Messung homogenisierten wir 2 gleichaltrige Weibchen in 0,65% NaCl-Lösung. Als Standard diente Humanalbumin.

Für alle Bestimmungen freier Aminosäuren wurden 80% Methanol-Extrakte hergestellt und zwei-dimensional chromatographiert (GEIGER, 1961). Die bei 510 nm abgelesenen Extinktionen wurden mittels Eichkurven aus reinen Aminosäuren in µMole umgerechnet. Pro Messung wurden 10 Weibchen gleichen Alters homogenisiert. Auf die quantitative Bestimmung von Prolin wurde verzichtet. Arginin, Lysin und Ornithin wurden zusammengefasst als 'Basische und Unbekannte', da sie sich mittels Papierchromatographie nur schlecht trennen liessen; Leucin und Isoleucin trennen sich gar nicht voneinander bei unserer Methodik. Weitere Überlagerungen ergeben sich zwischen Valin und Methionin sowie Leucin und Phenylalanin. Als spezifische Nachweisreaktionen kamen folgende zur Anwendung: Pauly-Reagens für Histidin, Platiniodid-Test für Methioninsulfoxid und die Sakaguchi-Reaktion für Arginin (CLOTTEN und CLOTTEN, 1962).

Zur Untersuchung einzelner Organe (Ovarien und Mitteldarm) wurden diese in Insekten-Ringerlösung den Weibchen entnommen. Es wurde darauf geachtet, die Organe unverletzt in den Mikro-Homogenisator zu bringen, um Verlusten

vorzubeugen. Die benötigte Anzahl war je nach Stadium sehr verschieden; sie bewegte sich zwischen 20 und 500 Stück.

Nach der Extraktion der freien Aminosäuren wurde der Rückstand in manchen Fällen einer sauren Hydrolyse unterworfen (6 N HCl, 120°C, 12 Stunden) und nochmals chromatographiert.

Die Untersuchung von Hühnchenblut geschah an 8–10-wöchigen Kücken, denen unter Chloroformnarkose Blut aus den Atrien entnommen wurde. Nach dessen Gerinnung bei Zimmertemperatur konnte durch Zentrifugation Serum gewonnen werden. Die Serumproteine wurden durch Hitze zur Koagulation gebracht, um deproteinisiertes Serum papierchromatographisch auf freie Aminosäuren zu testen. Die denaturierten Serumproteine und der Blutkuchen wurden lyophilisiert, hydrolysiert und dann ebenfalls chromatographiert.

Die Exkrete von Weibchen nach Blutmahl wurden in 24-Stunden-Perioden gesammelt bis nach erfolgter Eiablage. Dazu konstruierten wir spezielle Käfige von pyramidenförmiger Gestalt (20 × 20 × 25 cm). Die Exkrete fallen darin nahezu vollständig auf den Boden, der mit einem Filterpapier (Whatman No. 1, 20 × 20 cm) belegt war, welches nach 24 Stunden ausgewechselt wurde. Wenn darauf für eine Bestimmung die Exkrete von 500 Weibchen angereichert waren, wurde dieses Filterpapier in 800 ml dest. Wasser homogenisiert (TERZIAN *et al.*, 1957) über Nacht eluiert, anschliessend im Rotationsverdampfer bei 40°C eingeeengt und dann das Trockengewicht dieses 'Rohexkretes' bestimmt. Dann wurde es in 1 ml dest. Wasser aufgenommen, zentrifugiert und vom Überstehenden 400 µl mittels Hochspannungselektrophorese gereinigt; die Entsalzung durch Kunstharzsäulen (Dowex 2 und 50) erwies sich als ungünstiger. Die Reinigung geschah deshalb folgendermassen: das Überstehende des wässrigen Eluates wurde bandförmig auf Whatmanpapier No. 3 MM (57 × 37 cm) aufgetragen, mit 8% Ameisensäure besprüht und bei -4°C während 2 Stunden einer Spannung von 2500 V ausgesetzt (*ca.* 100 mA). Die Ninhydrin-positiven Stoffe waren nun von störenden Substanzen abgetrennt und konnten gesamthaft in Wasser eluiert, eingeeengt und zwei-dimensional aufgetrennt werden: in der ersten Dimension wurde nach punktförmiger Auftragung dieses Eluates auf die eben beschriebene Weise elektrophoretisch gearbeitet; in der zweiten Dimension wurde das getrocknete Papier aufsteigend mit 70% *n*-Propanol chromatographiert und dann mit Ninhydrin entwickelt. Dieses Vorgehen erwies sich nach mehreren Vorversuchen als optimal. Der wasserunlösliche Rückstand des Eluates wurde lyophilisiert und hernach einesteils saurer Hydrolyse unterzogen und andernteils zur Bestimmung von Harnsäure verwendet.

Für die Harnsäurebestimmung gelangte ein enzymatischer UV-Test zur Anwendung (PRAETORIUS, 1962). Die benötigte Uricase war ein Präparat aus Schweineleber (Biochemica, Mannheim). Pro Messansatz wurden 1 bis 2 mg des Rückstandes (Trockengewicht) in 10 ml Boratpuffer (pH 9,5) aufgenommen; davon wurden 20 bis 50 µl in Quarzcuvetten mit 3 ml Puffer pipettiert. Zehn Minuten nach Enzymzugabe (20 µl) konnte bei 293 nm die Endextinktion abgelesen und mittels einer Eichkurve aus reiner Harnsäure in µMol umgerechnet werden,

musste aber vorher um die Eigenextinktion des Enzyms korrigiert werden. Es wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet.

Die Statistische Sicherung von Mittelwerten erfolgte mit dem X-Test von VAN DER WAERDEN und NIEVERGELT (1956).

In sämtlichen Tabellen und Abbildungen werden die Aminosäuren mit den drei Anfangsbuchstaben abgekürzt; zusätzlich bedeutet: GLU.NH₂ = Glutamin, MSO = Methioninsulfoxid, CF = *Culex p. fatigans*, CP = *Culex p. pipiens*.

ERGEBNISSE

Frischgewicht und Stickstoffgehalt

Bei Weibchen von *C. p. fatigans* (CF) und *C. p. pipiens* (CP) wurden die Frischgewichte und der Stickstoffgehalt während je 5 Tagen nach Schlüpfen und nach dem Blutmahl in Intervallen von 24 Stunden bestimmt. Die Mittelwerte sind in Abb. 2 für beide Weibchentypen dargestellt.

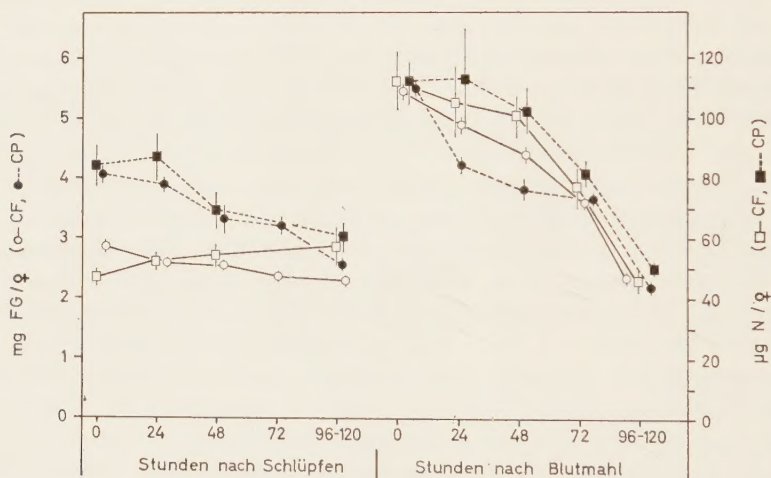


ABB. 2. Verlauf von Frischgewicht (FG) und Totalstickstoff (N) von *C. pipiens*-Weibchen während des Adultlebens. Aufgetragen sind die Mittelwerte und deren mittlerer Fehler ($n = 4-12$).

Zunächst stellt man fest, dass Frischgewicht und Stickstoffgehalt in ihrem Verlauf gut übereinstimmen, wobei der Totalstickstoff rund 5 Prozent des Frischgewichtes ausmacht. Die Weibchen von CP sind kurz nach dem Schlüpfen aus der Puppe gesichert schwerer als CF-Weibchen ($p < 0,01$) und enthalten nahezu doppelt soviel Stickstoff ($p < 0,01$). Die Werte von CF verändern sich im Laufe des Adultlebens kaum; der geringe Anstieg des Stickstoffes muss als Streuung gedeutet werden. Dagegen bei CP sinken Frischgewicht und Stickstoffgehalt in den ersten 5 Tagen des Adultlebens, zur Zeit der autogenen Eireifung. Die Eiablage manifestiert sich in einer Abnahme des Frischgewichtes der Weibchen

um rund 0,6 mg zwischen 72 und 96 Stunden nach Schlüpfen. Die Gewichts- und Stickstoffverluste vor 72 Stunden hängen wahrscheinlich mit der Abgabe des Meconiums zusammen. Nach der Eiablage sind CP-Weibchen gewichtsmässig nicht mehr zu unterscheiden von CF-Weibchen und zeigen den gleichen Stickstoffgehalt.

Durch ein Blutmahl wird das Frischgewicht bei beiden Mücken sprunghaft verdoppelt und ebenso der Stickstoffgehalt (Abb. 2). In den folgenden 4 Tagen treten Verdauung und Eireifung ein und das mit dem Blut aufgenommene Material wird sukzessive metabolisiert: bis 72 Stunden nach Blutmahl, also kurz vor der Eiablage ist bereits knapp 1/3 der im Saugakt aufgenommenen Menge ausgeschieden und ungefähr ein weiterer Drittel wird in Form des Eigeleges abgesetzt. Der verbleibende Drittel beträgt bei beiden Mücken gleich viel, 2,5 mg Gewicht und 50 μ g Stickstoff pro Weibchen. Es handelt sich hier offenbar um das Minimum an Gewicht und Stickstoff, welches die Weibchen aufweisen, wenn sie sich am Ende eines gonotrophen Zyklus befinden. Im folgenden wird dieses Minimum Residualwert genannt. Anhand weiterer Messungen werden wir darauf zurückkommen.

Proteingehalt

Zu den gleichen Zeitpunkten wie der Stickstoff wurden auch die Proteinmengen bestimmt. In Abb. 3 sind die Mittelwerte aus je 10 Messungen dargestellt als mg/Weibchen. Wiederum zeichnen sich die frisch geschlüpften CP-Weibchen

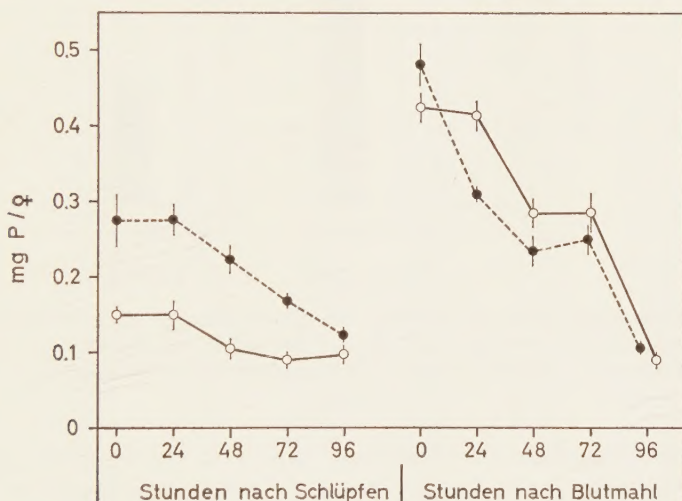


ABB. 3. Proteingehalt (mg P) von *C. pipiens*-Weibchen während des Adultlebens. Aufgetragen sind die Mittelwerte und deren mittlerer Fehler ($n = 10$).
○—○ = CF, ●---● = CP.

aus durch eine fast doppelte Proteinmenge gegenüber gleich alten CF-Weibchen ($p < 0,01$). Am ersten Tag bleiben diese Proteinwerte konstant, vermindern sich aber am zweiten und dritten Tag; die autogene Eiablage bei CP erfolgt zwischen

72 und 96 Stunden nach dem Schlüpfen und bedingt eine weitere Abnahme. Nachher enthalten beide Weibchentypen gleichviel Protein. Durch ein Blutmahl wird dieser Proteingehalt rund vierfach erhöht, nimmt aber in den folgenden 2 Tagen bereits wieder um die Hälfte ab; der ausgeprägte Proteinverlust zwischen 72 und 96 Stunden nach Blutmahl ist vorab auf die Eiablage zurückzuführen. Damit wird wiederum derselbe Wert wie vor dem Blutmahl erreicht, den wir auch hier Residualwert nennen; für beide Mücken beträgt er 0,1 mg Protein pro Tier.

Um weiteren Einblick in den Proteinstoffwechsel zu gewinnen, wurden bei legereifen CP-Weibchen (72 Stunden nach Schlüpfen) und CF-Weibchen (72 Stunden nach Saugakt) die Proteinmengen in den Ovarien gemessen: in autogen gereiften Ovarien (CP) sind 63 Prozent des gesamten Weibchenproteins enthalten und in anautogen gereiften (CF) 56 Prozent. Dieser Unterschied ist gesichert mit $p < 0,01$. In Abb. 4 sind die Werte des Proteingehaltes von je 10 Ovarmessungen dargestellt, verglichen mit den Proteinmengen der Weibchen nach Subtraktion der Ovarwerte. Es zeigt sich somit, dass nach Blutaufnahme in gereiften CF-Ovarien pro Gewichtseinheit gleich viel Protein enthalten ist wie im übrigen Muttertier.

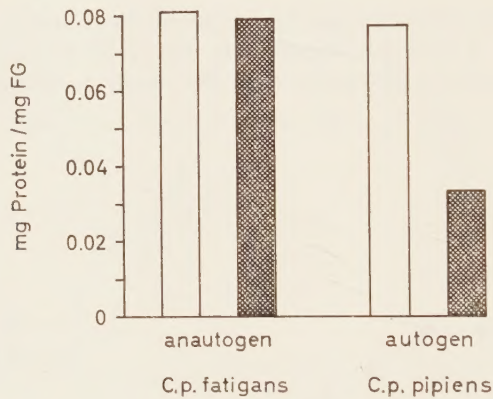


ABB. 4. Proteingehalt (mg Protein/mg Frischgewicht) der ausgereiften Ovarien von anautogenen und autogenen *C. pipiens*-Weibchen. Helle Säulen = Proteingehalt der Ovarien, dunkle Säulen = Proteingehalt von Weibchen minus Ovarmengen.

Anders bei autogenen CP-Weibchen: wohl ist die Proteinmenge in den Ovarien pro Gewichtseinheit dieselbe wie bei CF-Weibchen, aber in den restlichen Muttertieren findet sich nur die Hälfte dieser Menge (Abb. 4, letzte Säule).

Zu diesen Befunden bietet sich folgende Interpretation: Bei den CP-Weibchen wird während der autogenen Periode im reifenden Ovar Protein auf Kosten des gesamten Weibchenorganismus angereichert. CLEMENTS (1956) zeigte, dass die larvale Abdominalmuskulatur der Weibchen erst im frühen Adultleben abgebaut wird. Unsere Befunde scheinen zu bestätigen, dass Proteinreserven der Weibchen in die Ovarien verlagert werden. Bei den anautogenen CF-Weibchen ist der Fall

insofern anders, als die Ovarien nur nach einem Blutmahl reifen und ohne dass dabei Dotterproteine auf Kosten des mütterlichen Organismus gebildet werden müssen, da ja mit dem Blut reichlich Material aufgenommen wird.

Freie Aminosäuren während des Adultlebens

Der Übersichtlichkeit halber werden die Veränderungen der freien Aminosäuren in den Weibchenextrakten für die beiden Stämme getrennt beschrieben.

Bei CF beträgt die Summe aller freien Ninhydrin-positiven Stoffe kurz nach dem Schlüpfen $1,3 \mu\text{M}/10$ Weibchen und sinkt in den folgenden Tagen auf rund $2/3$ (Tabelle 1). Unmittelbar nach dem Blutmahl ist die Summe immer noch kleiner als nach dem Schlüpfen, steigt aber am zweiten und dritten Tage deutlich an, was mit dem Proteinabbau bei der Verdauung zusammenhängen dürfte. Vor der Eiablage nimmt die Summe wieder ab; offenbar werden jetzt die freien Aminosäuren in Dotterproteine eingebaut. Mit der Eiablage sinkt die Summe zwischen 72 und 96 Stunden nach Blutmahl nochmals und erreicht den Ausgangswert wie vor dem Blutmahl, einen Residualwert.

TABELLE 1—VERÄNDERUNGEN VON FREIEN AMINOSÄUREN WÄHREND DES ADULTLEBENS VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN

	Std nach Schlüpfen		Std nach Blutmahl				
	0 (n = 5)	96 (n = 3)	0 (n = 8)	24 (n = 6)	48 (n = 8)	72 (n = 8)	96 (n = 10)
α -ALA	0,270	0,175	0,288	0,320	0,370	0,251	0,125
β -ALA	0,034	0,031	0,047	0,046	0,059	0,044	0,065
ASP	0,021	0,016	0,019	0,050	0,049	0,036	0,011
GLU	0,053	0,046	0,086	0,143	0,106	0,075	0,052
GLU.NH ₂	0,245	0,138	0,158	0,186	0,237	0,276	0,238
GLY	0,018	0,015	0,042	0,036	0,042	0,013	0,002
HIS	0,168	0,105	0,086	0,257	0,208	0,145	0,132
LEU/ISO	0,037	0,019	0,020	0,067	0,070	0,025	0,017
MSO	0,129	0,144	0,103	0,104	0,098	0,111	0,089
SER	0,034	0,012	0,034	0,043	0,030	0,022	0,010
TAU	0,008	0,011	0,070	0,049	0,048	0,030	0,005
THR	0,027	0,023	0,024	0,030	0,031	0,028	0,025
TYR	0,044	0,014	0,015	0,024	0,033	0,020	0,016
VAL	0,046	0,016	0,018	0,053	0,052	0,015	0,012
Basische + Unbekannte	0,169	0,144	0,121	0,112	0,107	0,068	0,079
Summe	1,303	0,909	1,131	1,520	1,540	1,159	0,968

Mittelwerte in $\mu\text{M}/10$ Tiere, n = Zahl der Bestimmungen (Eiablage zwischen 72 und 96 Stunden nach Blutmahl).

Die einzelnen Aminosäuren nehmen entsprechend ihrer Gesamtsumme in den ersten Adulttagen nach dem Schlüpfen ab, ausser Methioninsulfoxid und Taurin, welche leicht ansteigen (Tabelle 1, Abb. 5). Zur Zeit von 0 Stunden nach

Blutmahl ist die absolute Menge einiger Aminosäuren erwartungsgemäss erhöht, so bei Alanin, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Serin und Taurin. Wie die Untersuchung des Blutes zeigt (S. 1149), vermag die aufgenommene Blutmenge diesen Anstieg jedoch nicht zu erklären. Andere Aminosäuren, wie Asparaginsäure, Histidin, Leucin/Isoleucin, Threonin, Tyrosin und Valin, zeigen keine oder eine unwesentliche Zunahme trotz Blutaufnahme.

Den meisten Aminosäuren gemeinsam ist der teils stark ausgeprägte Anstieg in den Weibchenextrakten innerhalb des ersten Tages nach einem Blutmahl. Merkliche Abnahme weisen in dieser Zeit vorab Taurin und Glycin auf (Abb. 5). Ihre Maximalwerte erreichen die einzelnen Aminosäuren in freier Form bei 24

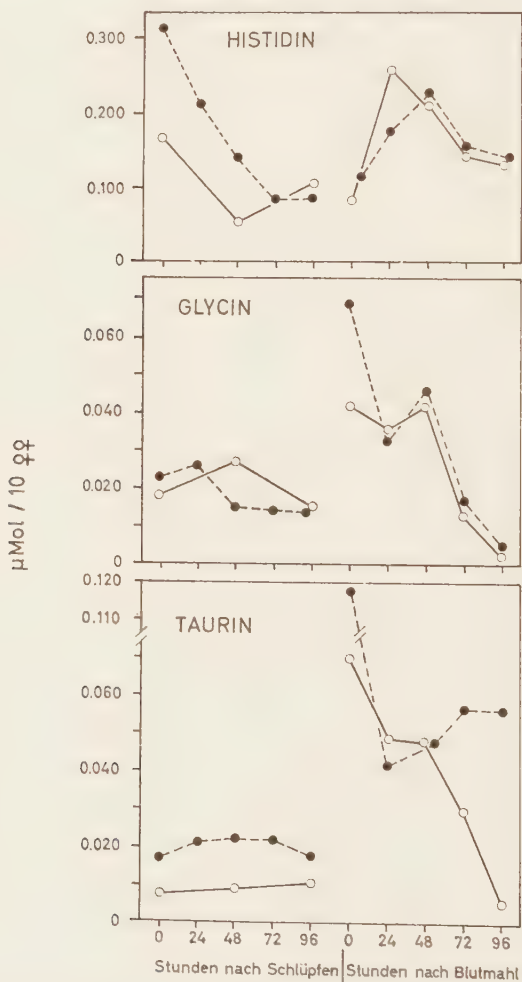


ABB. 5. Verlauf von Histidin, Glycin und Taurin während des Adultlebens von *C. p. fatigans* (○—○) und *C. p. pipiens* (●---●).

oder 48 Stunden nach Blutaufnahme. Taurin stellt einen Sonderfall dar, indem es vor dem Blutmahl und nach der Eiablage nur in geringer Menge nachzuweisen ist und vorab darin, dass es nach Blutmahl etwa sechsfach ansteigt, obschon die im Blut vorhandene Menge wesentlich geringer ist (S. 1149). Die anschliessend starke Abnahme ist umso erstaunlicher, als Taurin in den Eiern nur in Spuren vorkommt (CHEN *et al.*, 1967), in den Exkreten fehlt (S. 1156) und nicht in Proteine eingebaut wird (MEISTER, 1965). Die konzentrierteste aller freien Aminosäuren ist Alanin, welches im Bereiche von 20 bis 30 Prozent der Gesamtsumme schwankt, gefolgt von Glutamin, Methioninsulfoxid und Histidin. Alle übrigen Aminosäuren bleiben unterhalb 10 Prozent.

In Extrakten von CP-Weibchen (Tabelle 2) ist die Summe aller Ninhydrin-positiven Stoffe unmittelbar nach dem Schlüpfen höher als bei den entsprechenden CF-Weibchen, erreicht dann nach 96 Stunden ein ähnliches Niveau wie CF. Zur Zeit der autogenen Eiablage (72 bis 96 Stunden) erkennt man keine Abnahme der Gesamtsumme. Kurz nach dem Blutsaugen zeigen die CP-Weibchen höhere Werte an freien Aminosäuren als CF-Weibchen, obschon sie ungefähr gleich viel Blut erhielten (Abb. 2).

Verfolgt man die Werte der einzelnen Aminosäuren (Tabelle 2), so fällt auf, dass kurz nach Schlüpfen Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Leucin/Isoleucin, Tyrosin und Valin relativ stark vertreten sind und während der autogenen Eibildung eine ausgesprochene Abnahme aufweisen, besonders in den ersten 2 Tagen. Das lässt auf Einbau in die Dotterproteine schliessen. Anders verhalten sich Methioninsulfoxid, wie GEIGER (1961) gezeigt hat und Taurin (Abb. 5), denn beide steigen während der autogenen Eireifung an.

Nach einem Blutmahl zeigen die freien Aminosäuren mehrheitlich eine starke Zunahme, bis zum Maximum bei 48 Stunden und fallen dann wiederum ab, wie das bei CF der Fall war. Nach der Eiablage wird meist ein Residualwert erreicht, ausser Taurin, welches hier einen fünffach höheren Wert annimmt im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren und zu CF. Abweichend verhalten sich Alanin, Taurin, Glycin und Serin, indem sie kurz nach Blutmahl in sehr grosser Menge vorliegen (Taurin rund zehnfach erhöht), innerhalb 24 Stunden stark abnehmen und mit 48 Stunden ein zweites Maximum erreichen.

In der prozentualen Verteilung der freien Aminosäuren sind bei den beiden Mückenextrakten die folgenden am konzentriertesten: Alanin, Glutamin, Methioninsulfoxid, und Histidin (in abnehmender Folge) mit 30–5 Prozent der Gesamtsumme; alle andern bleiben unter 5 Prozent. Ganz ähnlichen Verlauf zeigen jeweiligen Leucin/Isoleucin und Valin innerhalb eines Stammes, sowie auch Glutamin und Histidin im CP-Extrakt. In beiden Mückentypen wird die Synthese von Dotterproteinen durch eine Abnahme der freien Aminosäuren angedeutet.

Aminosäuren in Hydrolysaten von C. pipiens-Weibchen

Die Rückstände nach der Extraktion der freien Aminosäuren wurden während der ersten Tage des Adultlebens bei beiden Weibchentypen hydrolysiert, um eventuell unterschiedliche Proteinzusammensetzungen festzustellen.

TABELLE 2—VERÄNDERUNGEN VON FREIEN AMINOSÄUREN WÄHREND DES ADULTLEBENS VON *C. p. pipiens*-WEIBCHEN

	Std nach Schlüpfen					Std nach Blutmahl				
	0 (n = 5)	24 (n = 4)	48 (n = 4)	72 (n = 4)	96 (n = 3)	0 (n = 6)	24 (n = 3)	48 (n = 5)	72 (n = 5)	96 (n = 7)
α -ALA	0,219	0,251	0,197	0,314	0,274	0,421	0,147	0,439	0,241	0,122
β -ALA	+	+	+	+	+	0,055	0,038	0,047	0,064	0,041
ASP	0,048	0,012	0,013	0,016	0,010	0,018	0,036	0,058	0,043	0,028
GLU	0,113	0,059	0,060	0,052	0,050	0,108	0,116	0,122	0,117	0,075
GLU.NH ₂	0,380	0,220	0,173	0,139	0,158	0,184	0,249	0,342	0,250	0,229
GLY	0,023	0,026	0,015	0,014	0,014	0,069	0,033	0,046	0,017	0,005
HIS	0,311	0,211	0,140	0,085	0,085	0,114	0,174	0,227	0,155	0,140
LEU/ISO	0,053	0,031	0,023	0,014	0,016	0,024	0,053	0,137	0,020	0,014
MSO	0,123	0,161	0,177	0,186	0,229	0,165	0,180	0,191	0,183	0,163
SER	0,042	0,023	0,016	0,016	0,018	0,058	0,043	0,072	0,024	0,018
TAU	0,017	0,021	0,022	0,022	0,018	0,118	0,042	0,048	0,057	0,056
THR	0,028	0,023	0,025	0,020	0,019	0,031	0,032	0,062	0,023	0,019
TYR	0,063	0,049	0,038	0,025	0,020	0,017	0,035	0,069	0,023	0,012
VAL	0,075	0,036	0,026	0,012	0,016	0,021	0,057	0,103	0,021	0,011
Basische + Unbekannte	0,262	0,208	0,200	0,113	0,138	0,126	0,148	0,221	0,152	0,121
Summe	1,757	1,331	1,125	1,028	1,065	1,529	1,383	2,184	1,390	1,054

Mittelwerte in $\mu\text{M}/10$ Tiere, n = Zahl der Bestimmungen (Eiablage: autogen zwischen 72 und 96 Stunden nach Schlüpfen, anautogen zwischen 72 und 96 Stunden nach Blutmahl). + Nur spurenweise vorhanden.

Der prozentuale Anteil einzelner Aminosäuren an den Gesamtproteinen ist bei beiden Mücken etwa derselbe: Alanin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin/Isoleucin 10 bis 15%; Arginin, Asparaginsäure, Lysin und Valin 5 bis 10%; Histidin, Serin, Threonin und Tyrosin 0 bis 5%. Demnach kann zwischen den Weibchen der beiden Stämme in der Zeit von 0 bis 96 Stunden nach dem Schlüpfen kein grundlegender Unterschied in der Verteilung der gebundenen Aminosäuren postuliert werden.

Die vorhin (Abb. 3) festgestellte höhere Proteinmenge der CP-Weibchen kurz nach dem Schlüpfen bestätigt sich in diesen Messungen, wenn auch weniger ausgeprägt, indem die Summe aller Aminosäuren im Hydrolysat von 0-stündigen CP-Weibchen 24,7 und von CF-Weibchen nur 17,3 $\mu\text{M}/10$ Tiere beträgt.

Vergleicht man die Summenwerte der gebundenen mit denjenigen der freien Aminosäuren pro Stadium, so ergibt sich, dass bei beiden Mücken höchstens 7 Prozent aller Aminosäuren in freier Form vorliegen. Im Laufe der ersten Adulttage sinkt dieser Prozentsatz bei den autogenen CP-Weibchen bis zur Hälfte (3,4 Prozent), was erneut auf Einbau freier Aminosäuren in die Dotterproteine hindeutet.

Untersuchung des Wirtsblutes

Die Differenz der freien Aminosäuren in Weibchenhomogenaten vor und kurz nach dem Saugakt zeigt andeutungsweise, wieviele Aminosäuren mit dem Blute in den Mückenkörper gelangen. Man weiss aber nicht, ob und wie rasch die Verdauungsvorgänge dieses Bild beeinflussen. Deshalb wurde direkt frisches Blut untersucht und aus der Gewichts-differenz der Weibchen vor und nach Blutmahl eine wahrscheinliche Blutaufnahme errechnet (Tabelle 3).

TABELLE 3—AMINOSÄUREN DES BLUTES VOM HÜHNCHEN

	Freie Aminosäuren	Serum- Hydrolysat	Blutkuchen- Hydrolysat
α -ALA	0,012	0,32	4,32
ARG	0,001	0,22	1,81
ASP	0,005	0,23	2,21
GLU	0,015	0,57	3,34
GLU.NH ₂	0,030		
GLY	0,013	0,18	2,48
HIS	+	0,12	3,35
LEU/ISO	0,004	0,44	4,90
LYS	0,004	0,47	4,26
ORN	0,004		
SER	0,011	0,19	1,27
TAU	0,007		
THR	0,006	0,17	1,74
TYR	0,002	0,10	0,84
VAL	0,003	0,33	2,91
Unbekannte	0,006		
Summe	0,123	3,34	33,43

Berechnet als Aufnahme in μM pro 10 Weibchen aus der Gewichts-differenz vor und nach Saugakt.

Im Serum sind folgende freie Aminosäuren am stärksten konzentriert: Glutamin 25%, Glutaminsäure, Glycin und Alanin je etwa 10% und die andern weniger als 10%. Bei den Hydrolysaten der gefällten Serumproteine stellen Glutaminsäure, Lysin, Leucin/Isoleucin, Valin und Alanin die Hauptvertreter dar und im Hydrolysat des Blutkuchens kommt noch Histidin dazu. Als Summenverhältnis der Aminosäuren in den drei Blutkomponenten ergibt sich folgendes: freie Aminosäuren zu Serumprotein zu Blutkuchen wie 1 : 27 : 270.

Ein quantitativer Vergleich zwischen den im Blut ursprünglich vorhandenen freien Aminosäuren mit der Aminosäurendifferenz von Weibchen vor und nach dem Saugen zeigt, dass für einige Aminosäuren, wie Asparaginsäure, Glutamin, Leucin/Isoleucin, Threonin und Valin, die beobachtete mit der berechneten Zunahme bei beiden Mückenstämmen einigermassen übereinstimmt. Für andere Aminosäuren sind die beobachteten Werte jedoch stets viel höher als die berechneten. Dies bedeutet, dass in einer äquivalenten Blutmenge von solchen Aminosäuren, wie Alanin und Taurin, offensichtlich weniger Mikromole vorhanden sind als die Zunahme in Weibchenextrakten wirklich aufweist; besonders deutlich erhöht ist die beobachtete Totalmenge freier Aminosäuren, welche das Zwei- bis Fünffache der berechneten ausmacht. Folgende Erklärung ist denkbar: aus technischen Gründen dauert es vom Einstich eines Weibchens ins Kücken bis zum Moment des Homogenisierens 1 bis 3 Stunden; der Stechakt nimmt aber nur 2 bis 5 Minuten in Anspruch. Somit hat die Mücke Zeit, bereits Blut zu verdauen. Bei CP-Weibchen ist das noch ausgeprägter, weil wir sie länger als CF am Kücken saugen lassen mussten. Allerdings zeigten FISK und SHAMBAUGH (1952) bei *Aedes aegypti*, dass die Aktivität der proteolytischen Enzyme in den ersten 4 Stunden nach Blutaufnahme nur wenig zunimmt und ihr Maximum erst nach 18 Stunden erreicht (27°C).

Jedenfalls ergibt das Muster der freien Aminosäuren von Weibchen kurz nach dem Blutmahl kein exaktes Bild über die tatsächlich mittels Blut der Mücke zugeführten freien Aminosäuren. Deshalb wird im folgenden der Darminhalt direkt untersucht.

Darminhalt von C. p. fatigans-Weibchen nach Blutmahl

Bei CF-Weibchen wurden vom Blutmahl bis zur Eiablage die freien Aminosäuren in Mitteldarmextrakten und in Hydrolysaten des Rückstandes chromatographisch untersucht (Tabelle 4).

Der Darmgehalt von 0,228 μ M freier Aminosäuren kurz nach Blutmahl steht in guter Uebereinstimmung mit dem Gesamtzuwachs von 0,222 μ M in Weibchenextrakten von CF; jedoch ist er grösser als die in einer entsprechenden Blutmenge vorhandene Aminosäurenmenge von 0,123 μ M (Tabelle 3), was auf Verdauung hinweist.

Die Summe freier Aminosäuren erreicht in Darmextrakten das Maximum mit 24 Stunden und nimmt bis 48 Stunden nur wenig ab (Tabelle 4). Beachtlich ist die Veränderung der Relation von freien zu gebundenen Aminosäuren: der Prozentsatz der freien nimmt zu von 0,9 Prozent (0 Stunden) auf 19,4 Prozent (48 Stunden), was nochmals auf rege Verdauungstätigkeit des Mitteldarmes deutet.

TABELLE 4—FREIE (FA) UND GEBUNDENE (H) AMINOSÄUREN IN MITTELDARMHOMOGENATEN VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN NACH BLUTMAHL

	Stunden nach Blutmahl							
	0		24		48		72	
	(n = 3)		(n = 3)		(n = 7)		(n = 2)	
	FA	H	FA	H	FA	H	H	
α -ALA	0,030	3,70	0,097	1,93	0,071	0,37	0,06	
ASP	0,007	2,34	0,030	1,39	0,028	0,30	0,06	
GLU	0,029	3,15	0,042	1,71	0,031	0,39	0,08	
GLU.NH ₂	0,032		0,128		0,076			
GLY	0,016	2,16	0,041	1,45	0,015	0,31	0,06	
HIS		2,26	0,037	0,84	0,055	0,20	0,02	
LEU/ISO	0,018	3,82	0,100	2,05	0,085	0,45	0,08	
SER	0,009	1,04	0,024	0,56	0,011	0,12	0,03	
TAU	0,013		0,009		+			
THR	0,017	1,12	0,041	0,51	0,030	0,11	0,03	
TYR	+	0,39	0,024	0,17	0,023	0,03	0,02	
VAL	0,013	2,43	0,058	1,29	0,052	0,26	0,04	
Basische + Unbekannte	0,044	2,87	0,084	1,44	0,138	0,63	0,12	
Summe	0,228	25,28	0,715	13,34	0,615	3,17	0,60	
Abnahme von H		42		22		5	1	
(FA/H) $\times$ 100	0,9%		5,4%		19,4%			

Mittelwerte in $\mu\text{M}/10$ Tiere, n = Zahl der Bestimmungen.

Die einzelnen freien Aminosäuren haben einen ähnlichen Verlauf wie ihre Gesamtsumme, ausser Histidin und den basischen, welche stetig zunehmen und ausser Taurin, welches dauernd abnimmt. Um die Situation zur Zeit des Blutmahles mit den Weibchen-Extrakten zu vergleichen, werden in Tabelle 5 einige

TABELLE 5—VERGLEICH DER ZUNAHME EINIGER FREIER AMINOSÄUREN DURCH BLUTAUFNAHME VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN MIT DEM GEHALT IM DARMS

	Weibchen vor Blutmahl	Weibchen nach Blutmahl	Differenz (= Zunahme)	Im Darm
Totalmenge	0,909	1,131	0,222	0,228
GLU.NH ₂	0,138	0,158	0,020	0,032
α -ALA	0,175	0,288	0,113	0,030
TAU	0,011	0,070	0,059	0,013
HIS	0,105	0,086	-0,019	+
MSO	0,144	0,103	-0,041	+

Werte in $\mu\text{M}/10$ Tiere.

Beispiele zusammengestellt. Für Glutamin trifft es zu, dass die Zunahme im Weibchen recht gut dem Darminhalt entspricht. Bei Alanin und Taurin ist der Darmgehalt jedoch geringer als die Zunahme der Weibchen, was auf rascher Absorption beruhen könnte. Die Abnahme von Histidin lässt sich eindeutig auf die Exkretion zurückführen (vergl. S. 1155), aber für die Methioninsulfoxid-Abnahme gibt es vorderhand keine Erklärung.

So kommt man zur Überzeugung, dass die genannte Übereinstimmung der Totalmengen im Darm und im Weibchen eher zufällig ist, indem gewisse Aminosäuren einesteils vermehrt im Weibchen nachzuweisen sind und andernteils durch Exkretion oder auf andere, unbekannte Weise abnehmen.

Auffallend ist das Verhalten von Taurin, wie bereits früher festgestellt wurde (S. 1147). Es ist also weder im Blut noch im Mitteldarm in ausreichender Menge zu finden, um den steilen Anstieg in Weibchen kurz nach Blutaufnahme zu erklären. Seine Bedeutung im Intermediärstoffwechsel während der Verdauung und Eireifung geht auch daraus hervor, dass es nach jedem gonotrophen Zyklus bei CF auf minimale Werte sinkt (Abb. 5), aber in Ovar und Exkret fehlt; bei CP sinkt Taurin nach der Eiablage jedoch nicht.

Die Aminosäuren der Darmhydrolysate zeigen während der 3 Tage der Verdauung und Eireifung ausnahmslos eine starke Abnahme, deren Verlauf sich im Verhältnis der Gesamtsummen manifestiert: 42 : 22 : 5 : 1 (Tabelle 4). Es stellt sich jetzt die Frage, wie dieses Material auf die reifenden Ovarien und auf die Exkrete verteilt wird.

Untersuchung der Ovarien von C. p. fatigans und C. p. pipiens

Es geht in diesem Abschnitt darum zu untersuchen, welche und wieviele der Aminosäuren, die mit dem Blut in den Darm gelangten, in die reifenden Ovarien eingebaut werden und allfällige Unterschiede zwischen autogen und anautogen reifenden Ovarien aufzudecken.

Zu denselben Zeitpunkten, da die Ovarien hydrolysiert wurden, bestimmten wir auch die Volumina einzelner Eifollikel unter Benutzung der Formel für den Kreiszylinder (Abb. 1, Tabelle 8).

In ausgereiften, 72-stündigen Ovarien von CF (Tabelle 6) dominieren unter den freien Aminosäuren Glutaminsäure (19%), Alanin (18,6%), Glutamin (13,7%), und Methioninsulfoxid (9,3%), bei einer Gesamtsumme von 0,226 μM . Taurin fehlt, was mit den Befunden von CHEN *et al.* (1967) zu vereinbaren ist, indem auch in den *Culex*-Eiern dieser Stoff nur in Spuren vorkommt.

Die kleinen Ovarien des Ruhestadiums, wie sie 0 Stunden nach Blutmahl bei CF noch vorliegen, enthalten 0,11 μM und nehmen dann bis zur Reife im Verhältnis 1 : 7 : 100 : 155 zu. Es werden demnach bei CF zwischen 24 und 48 Stunden am meisten Proteine eingelagert. Übereinstimmend mit der Aminosäurenmenge der Hydrolysate ist auch die Grösse der Ovarien zu diesen Zeitpunkten, was aus Tabelle 8 hervorgeht, wo diese Werte mit dem Follikelvolumen in Beziehung gesetzt wurden: von 0 bis 24 Stunden sinkt der Proteingehalt pro Volumen von $0,58 \times 10^{-8}$ auf $0,13 \times 10^{-8} \mu\text{M}/\mu^3$, weil das Follikelwachstum grösser ist als der

Proteineinbau; von 24 bis 48 Stunden steigt der Proteingehalt/Volumen, was gegenüber dem Wachstum erhöhten Proteineinbau anzeigt; von 48 bis 72 Stunden bleibt der Wert konstant, indem jetzt Wachstum und Proteineinbau in gleichen Raten vorsichgehen.

TABELLE 6—ZUNAHME DER AMINOSÄUREN IN OVARYDROLYSATEN WÄHREND DER ANAUTOGENEN EIBILDUNG VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN

	Stunden nach Blutmahl				
	0 (n = 2)	24 (n = 1)	48 (n = 4)	72 (n = 4)	
α-ALA	0,02	0,11	1,11	0,042	1,80
ASP	0,01	0,09	1,17	0,012	1,60
GLU	0,01	0,12	1,50	0,043	2,22
GLU.NH ₂				0,031	
GLY	0,00	0,09	1,09	0,010	1,88
HIS	0,01	0,03	0,77		1,05
LEU/ISO	0,02	0,12	1,32	0,017	2,03
MSO				0,021	
SER	0,00	0,04	0,52	0,005	0,80
THR	0,01	0,03	0,38		0,57
TYR		0,02	0,41	0,018	0,61
VAL	0,02	0,07	0,95	0,013	1,31
Übrige	0,00	0,09	1,98	0,014	3,20
Summe	0,11	0,81	11,20	0,226	17,07
Zunahmerate	1	7	100		155
Eizahl/10 Weibchen					1335

Bei 72 Stunden wurden auch die freien Aminosäuren gemessen vor der Hydrolyse. Mittelwerte in $\mu\text{M}/10$ Tiere, n = Zahl der Bestimmungen.

Am Aufbau der Dotterproteine reifer CF-Ovarien sind die basischen Aminosäuren stark beteiligt (18,7%) zusammen mit Glutaminsäure (13%), Leucin/Isoleucin (12%), Glycin und Alanin (je 11%).

In autogen gereiften Ovarien von CP-Weibchen (Tabelle 7) ist die Summe der freien Aminosäuren ähnlich wie bei CF und ebenso die Einzelwerte, ausser Glycin, welches in CP-Ovarien schwächer konzentriert ist. Dass der Methioninsulfoxid-Gehalt in beiden Ovarientypen gleich lautet ist insofern erstaunlich, als im CF-Weibchen zu dieser Zeit (72 Stunden) fünfmal mehr und in CP-Weibchen gar neunmal mehr Methioninsulfoxid gefunden wird (GEIGER, 1961 und Tabelle 1 und 2).

Die Hydrolysate der 72-stündigen CP-Ovarien zeigen, dass autogen gereifte Ovarien absolut weniger Protein enthalten als die anautogenen. Auch der Einbau von Protein während der Eireifung zeigt ein zu CF unterschiedliches Verhältnis: 1 : 4 : 6 : 52. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, ist hier die Zeitspanne der grössten Dottereinlagerung zwischen 48 und 72 Stunden nach Schlüpfen; der Proteingehalt

pro Follikelvolumen (Tabelle 8) nimmt zur selben Zeit am meisten zu. Es scheint also, dass nach einem Blutmahl die zur Dottersynthese benötigten Aminosäuren schneller oder in höherem Angebote bereitgestellt werden können als bei der autogenen Eireifung, wo sie zuerst aus den larvalen Reserveproteinen mobilisiert werden müssen (CLEMENTS, 1956).

TABELLE 7—ZUNAHME DER AMINOSÄUREN IN OVARHYDROLYSATEN WÄHREND DER AUTOGENEN EIBILDUNG VON *C. p. pipiens*-WEIBCHEN

	Stunden nach Schlüpfen				
	0 (n = 1)	24 (n = 1)	48 (n = 1)	72 (n = 5)	
α -ALA	0,02	0,07	0,14	0,035	1,12
ASP	0,01	0,06	0,13	0,011	1,20
GLU	0,02	0,09	0,17	0,033	1,44
GLU.NH ₂				0,020	
GLY	0,01	0,05	0,00	0,001	1,12
HIS	0,01	0,13	0,08		0,41
LEU/ISO	0,03	0,09	0,18	0,015	1,15
MSO				0,020	
SER	0,01	0,03	0,08	0,002	0,44
THR	0,02	0,03	0,06		0,23
TYR	0,01	0,02	0,04	0,024	0,21
VAL	0,02	0,06	0,12	0,010	0,82
Übrige	0,02	0,09	0,13	0,027	1,17
Summe	0,18	0,72	1,13	0,198	9,31
Zunahmerate	1	4	6		52
Eizahl/10 Weibchen					855

Bei 72 Stunden wurden auch die freien Aminosäuren gemessen vor der Hydrolyse. Mittelwerte in $\mu\text{M}/10$ Tiere, n = Zahl der Bestimmungen.

TABELLE 8—BEZIEHUNG ZWISCHEN FOLLIKELVOLUMEN UND OVARHYDROLYSAT WÄHREND DER ANAUTOGENEN (CF) UND AUTOGENEN (CP) EIREIFUNG VON *C. pipiens*-WEIBCHEN

	Std nach Blutmahl (CF) resp. Schlüpfen (CP)			
	0	24	48	72
CF-Weibchen:				
μM Hydrolysat/1 Follikel	$0,82 \times 10^{-4}$	$0,61 \times 10^{-3}$	$0,84 \times 10^{-2}$	$1,28 \times 10^{-2}$
μ^3 Volumen/1 Follikel	14×10^3	486×10^3	$2,55 \times 10^6$	$3,77 \times 10^6$
$\mu\text{M}/\mu^3$	$0,58 \times 10^{-8}$	$0,13 \times 10^{-8}$	$0,33 \times 10^{-8}$	$0,34 \times 10^{-8}$
CP-Weibchen:				
μM Hydrolysat/1 Follikel	$0,21 \times 10^{-3}$	$0,84 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-2}$	$1,10 \times 10^{-2}$
μ^3 Volumen/1 Follikel	18×10^3	138×10^3	$1,20 \times 10^6$	$3,30 \times 10^6$
$\mu\text{M}/\mu^3$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,61 \times 10^{-8}$	$0,11 \times 10^{-8}$	$0,33 \times 10^{-4}$

In Abb. 6 werden die prozentualen Zusammensetzungen der Hydrolysate von 0-stündigen Ovarien (Ruhestadium, Abb. 1) verglichen mit 72-stündigen Ovarien nach autogener bzw. anautogener Reifung. Bei beiden Mücken sind die prozentualen Anteile einzelner Aminosäuren im reifen Ovar sehr ähnlich; lediglich die basischen überwiegen deutlich in CF-Ovarien gegenüber CP-Ovarien. Dagegen in den Ruheovarien weisen die Hydrolysate eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung auf: diejenigen von CP enthalten viel mehr basische Aminosäuren und Tyrosin als solche von CF; umgekehrt sind in den CF-Ruheovarien Alanin und Valin stärker beteiligt am Proteinaufbau als in CP-Ruheovarien.

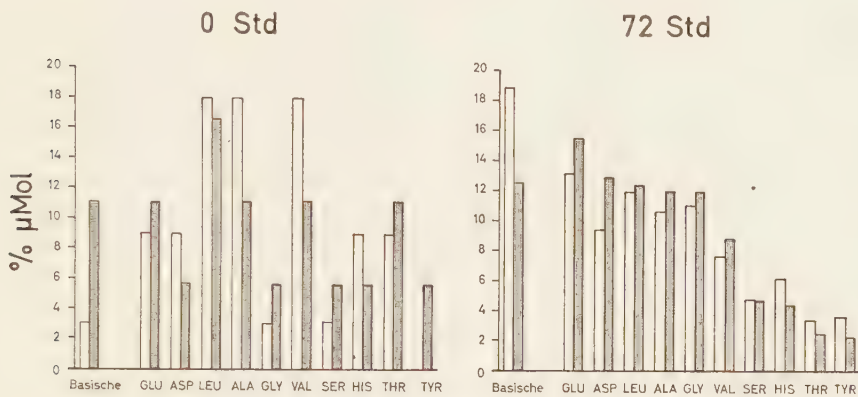


ABB. 6. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der Hydrolysate von Ovarien im Ruhestadium (0 Stunden) und kurz vor Eiablage (72 Stunden) bei anautogenen (helle Säulen, CF) und autogenen (dunkle Säulen, CP) *C. pipiens*-Weibchen.

Exkretion nach Blutmahl

Die bei beiden Mückenstämmen gesammelten Weibchenexkrete wurden während der anautogenen Periode auf Aminosäuren und Harnsäure untersucht und die Werte auf des Trockengewicht des Rohexkretes (S. 1141) von 10 Weibchen bezogen (Tabelle 9). Da die Aminosäurenausscheidung bei beiden Typen recht ähnlich ist, beschränken wir uns im wesentlichen auf die CF-Exkrete.

Das Ausscheidungsmaximum von Aminosäuren—freien wie gebundenen—liegt zwischen 24 und 48 Stunden nach Blutmahl, also zur Zeit des intensivsten Proteineinbaues ins Ovar (Tabellen 6 und 8). Allgemein liegen die Summenverhältnisse der freien zu den gebundenen Aminosäuren in allen Exkretproben nahe bei 1 : 1.

Am ersten Tag nach Blutmahl sind von den in freier Form ausgeschiedenen Aminosäuren fast 80% Histidin, am zweiten Tag 60% und am dritten Tag, vor der Eiablage, noch ca. 20%. Die meisten übrigen freien Aminosäuren erreichen ihr relatives Maximum zwischen 48 und 72 Stunden nach Saugakt und nur wenige nach der Eiablage. Bemerkenswert ist hierbei der verhältnismässig hohe Anteil von Methioninsulfoxid, der bei CP noch grösser ist. Spurenweise und sporadisch abgegeben werden Asparagin, Cystin, Methionin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin.

TABELLE 9—FREIE (FA) UND GEBUNDENE (H) AMINOSÄUREN IN DEN EXKRETEN VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN NACH BLUTMAHL

	Stunden nach Blutmahl							
	0-24		24-48		48-72		72-120	
	FA	H	FA	H	FA	H	FA	H
α -ALA	0,002	0,003	0,007	0,007	0,008	0,010	0,001	0,001
ASP	+	0,008	0,005	0,018	0,007	0,018	0,003	0,004
GLU	0,004	0,007	0,011	0,022	0,012	0,025	0,001	0,004
GLU.NH ₂	0,020		0,032		0,021			
GLY	0,005	0,138	0,022	0,355	0,005	0,053	0,004	0,013
HIS	0,201	0,038	0,244	0,080	0,033	0,014	0,003	
LEU/ISO	0,003	0,005	0,011	0,013	0,012	0,013	0,002	0,003
LYS/ORN	0,003	0,003	0,009	0,006	0,008	0,006	0,001	0,001
MSO	0,001		0,018		0,026		0,010	
SER	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	+
THR	0,014	0,018	0,036	0,043	0,034	0,034	0,009	0,009
VAL	0,003	0,003	0,007	0,009	0,008	0,009	0,001	0,002
Unbekannte	+		0,003	0,001	+	+	+	+
Summe	0,257	0,224	0,406	0,555	0,175	0,183	0,037	0,037
FA + H	0,481		0,961		0,358		0,074	
Rohexkret in mg/10 Weibchen	0,67		1,05		0,70		0,26	

Mittelwerte von je zwei Bestimmungen in μ M/10 Weibchen-Exkret (Trockengewicht).

In den Hydrolysaten der Exkrete ist Glycin die Hauptkomponente mit einem Ausscheidungsmaximum von 50 bis 60% am ersten und zweiten Tag nach Blutmahl. Die übrigen gebundenen Aminosäuren erreichen einen Höhepunkt am dritten Tag.

In Tabelle 10 wurden die summierten Werte der während der ganzen Eireifungszeit ausgeschiedenen Aminosäuren zusammengestellt. Gewichtsmässig geben beide Mücken gleich viel Rohexkret ab in dieser Zeit, aber die Konzentrationen sind unterschiedlich, indem CP-Weibchen rund 1/5 mehr Aminosäurenmaterial austossen. Die hohen Anteile von Glycin und freiem Histidin sind für beide Mückentypen sehr charakteristisch. Taurin und Histamin konnten als Exkretionsprodukte zu keiner Zeit nachgewiesen werden.

Die Bestimmungen der Harnsäure erfolgten am selben Exkretmaterial wie die vorhergehenden Messungen. In Tabelle 11 sind diese Resultate ebenfalls nur für CF-Weibchen aufgeführt, da sie für CP nicht wesentlich anders lauten.

Die maximale Harnsäureabgabe fällt in die Zeit zwischen 24 und 48 Stunden nach Blutaufnahme, also in die Periode der intensiven Dottersynthese und Aminosäurenausscheidung. Am nächsten Tag ist sie geringer und kann nach der Eiablage vernachlässigt werden. Denselben Verlauf findet man während der anautogenen Periode von CP-Weibchen, nur liegen dort die einzelnen Werte

rund 50 Prozent höher. Die nach Eiablage jedoch bei beiden Weibchentypen gleich niedrige Harnsäureausscheidung steht wahrscheinlich mit den festgestellten Residualwerten in Zusammenhang.

TABELLE 10—GESAMTEXKRETION FREIER (FA) UND GEBUNDENER (H) AMINOSÄUREN WÄHREND DER ANAUTOGENEN EIBILDUNG (0 BIS 72 STUNDEN NACH BLUTMAHL) VON *C. pipiens*-WEIBCHEN

	<i>C. p. fatigans</i>				<i>C. p. pipiens</i>			
	FA	%	H	%	FA	%	H	%
α -ALA	0,017	2,0	0,020	2,1	0,010	1,0	0,026	2,1
ARG	+				0,067	6,9	0,070	5,6
ASP	0,012	1,4	0,044	4,6	0,009	0,9	0,027	2,2
GLU	0,027	3,2	0,054	5,6	0,004	0,4	0,043	3,5
GLU.NH ₂	0,073	8,7			0,021	2,2		
GLY	0,032	3,8	0,546	56,8	0,009	0,9	0,612	49,3
HIS	0,478	57,0	0,132	13,7	0,660	68,0	0,285	23,0
LEU/ISO	0,026	3,1	0,031	3,2	0,014	1,4	0,029	2,3
LYS/ORN	0,020	2,4	0,015	1,6	0,023	2,4	0,010	0,8
MSO	0,045	5,4			0,096	9,9		
SER	0,003	0,4	0,003	0,3	0,004	0,4	0,006	0,5
THR	0,084	10,0	0,095	9,9	0,042	4,3	0,076	6,1
VAL	0,018	2,1	0,021	2,2	0,009	0,9	0,032	2,6
Übrige	0,003	0,4	0,001	0,1	0,004	0,4	0,027	2,2
Summe	0,838		0,962		0,972		1,243	
FA + H		1,800				2,215		
Rohexkret in mg/10 Weibchen		2,42				2,41		

Absolutwerte in μ M/10 Weibchen.

Der Anteil von Harnsäure am Gesamtexkret in mg beträgt höchstens 30 Prozent vom Trockengewicht und das nur am zweiten Tage (bei CP 48 Prozent). Bei *Rhodnius* ist dieser Wert etwa 80–90 Prozent (WIGGLESWORTH, 1931; HARINGTON, 1961). Um aber mit unseren vorangehenden Resultaten zu vergleichen, wurde aus diesen Daten der Stickstoffgehalt der abgegebenen Harnsäure berechnet, ebenso der Amino-Stickstoff der Exkrete (Tabelle 11). Die Stickstoffbilanz in Abb. 7 vermittelt ein Bild, wieviel des mit dem Blute aufgenommenen Stickstoffes und in welcher Form wieder aus dem Weibchen verschwindet. Die drei Säulen repräsentieren den Stickstoffgehalt pro Weibchen vor Saugakt, kurz nachher und nach der Eiablage; diese dritte Säule stellt also den Residualwert des Stickstoffes dar. Demzufolge werden rund 55 μ g Stickstoff pro Weibchen durch Blut aufgenommen, 59 Prozent davon in Form der Eiflosse und Exkretionsprodukte wieder abgegeben und 41 Prozent bleiben als Residualwert erhalten. Von den Exkretionsprodukten erscheinen 64 Prozent des Stickstoffes als Harnsäure, 16 Prozent als Aminostickstoff die restlichen 20 Prozent in unbekannter Form. Diese Angaben liegen etwas höher

als die von IRREVERRE und TERZIAN (1959) beschrieben; in jener Arbeit wurde aber nach einem anderen Zeitplan gesammelt.

TABELLE 11—HARNSÄUREEXKRETION UND STICKSTOFFVERLUST VON *C. p. fatigans*-WEIBCHEN NACH BLUTMAHL

	Stunden nach Blutmahl			
	0-24	24-48	48-72	72-96
mg Harnsäure/10 Weibchen	0,151	0,310	0,042	0,008
% vom Rohexkret	22,5	30,0	6,0	3,0
µg N/Weibchen	5,0	10,3	1,4	0,3
Amino-N/Weibchen	1,4	2,3	0,6	0,1

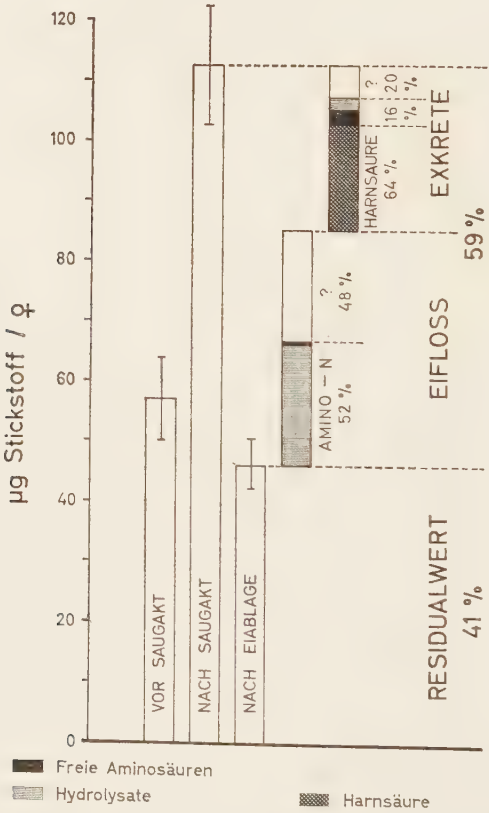


ABB. 7. Stickstoffbilanz von *C. p. fatigans*-Weibchen während der Periode der Eibildung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass durch das Blutmahl mehr stickstoffhaltige Substanz aufgenommen als für die Eibildung unmittelbar 'gebraucht' wird, denn 2/5 davon gehen als Exkrete wieder weg. Bei CP ist dieses Faktum noch etwas ausgeprägter, indem dort wenig mehr als die Hälfte des aufgenommenen Stickstoffes im Exkret ausgeschieden wird.

In Abb. 8 wird die Verteilung der durch ein Blutmahl aufgenommenen Aminosäuren auf Darmgehalt, Ovargehalt und Exkrete am Beispiel von CF-Weibchen in μ Molen dargestellt. Die erste Säule veranschaulicht den Inhalt des vollgesogenen Mitteldarmes, wobei die Verteilung der freien, in Plasma und Blutkuchen gebundenen Aminosäuren aus den Daten des Hühnchenblutes berechnet und eingezeichnet wurde. Dieser Darminhalt wird rasch und stark vermindert, aber nur ein kleiner Teil davon wird in Form von Aminosäuren ausgeschieden (letzte Säule). Auch aus dieser Darstellung geht hervor, dass die reifen Ovarien schliesslich nur etwa 2/3 aller im 0-stündigen Darm gefundenen Aminosäuren enthalten.

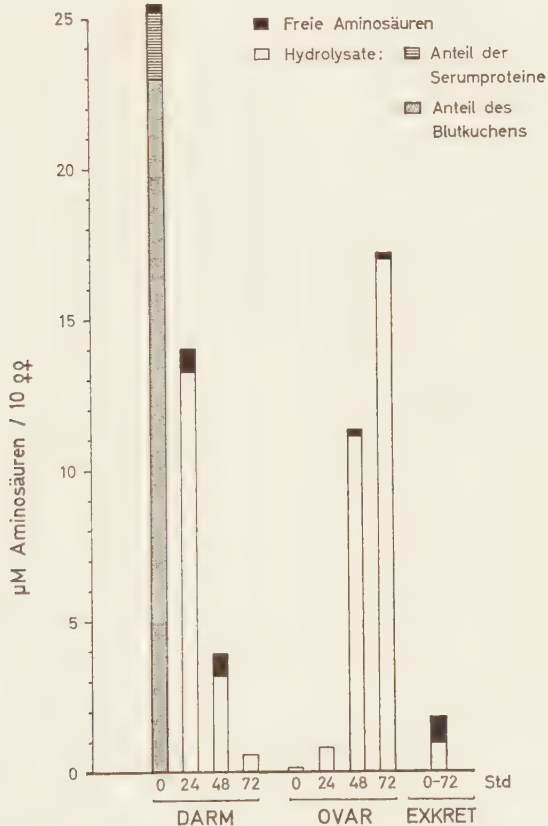


ABB. 8. Vergleich von Aminosäurenmateriale in Darm, Ovar und Exkreten bei *C. p. fatigans*-Weibchen nach einem Blutmahl während der Eibildung.

DISKUSSION

Gonotropher Zyklus und Proteinstoffwechsel

Verfolgt man die Frischgewichte, den Totalstickstoff- und Proteingehalt und die freien Aminosäuren während des Adultlebens von *Culex*-Weibchen über mehrere Tage, so stellt man fest, dass nach Eiablage (1) Residualwerte erreicht werden wie sie vor der Eireifung vorliegen und (2) dass diese Residualwerte gleich sind bei autogenen und anautogenen Weibchen (Abb. 2 und 3, Tabellen 1 und 2). Da zu diesen Untersuchungen Weibchen verschiedenen Alters benutzt wurden, kann man verallgemeinernd sagen, dass also bei *Culex pipiens*-Weibchen nach jedem gonotrophen Zyklus im gesamten Proteinstoffwechsel ein Zustand mit minimalen Werten erreicht wird, welche in der Regel nicht unterschritten werden. Auch bei der Proteasenaktivität des Mitteldarmes wurde dasselbe von FISK und SHAMBAUCH (1952) gefunden. Jedesmal wenn Weibchen sich mit Blut vollsaugen, nehmen alle diese Grössen schlagartig zu und es beginnt eine Eireifungsperiode, die bei den untersuchten Weibchentypen nach 4 Tagen (25°C) mit der Ablage eines Eiflosses endet; auch die Verdauung ist in dieser Zeit meist abgeschlossen und vollständig (WIGGLESWORTH, 1943).

Diese physiologischen Vorgänge stehen in Einklang mit den morphologischen: vor der Eireifung befinden sich die Follikel im Ruhestadium IIb (Abb. 1) und ebenso nach einer Eiablage. Das Ovar im Ruhestadium ist also mit einem Ruhestoffwechsel korreliert, der sich in den Residualwerten manifestiert. Vielleicht darf man das für alle blutsaugenden Culicinen annehmen.

Eine Ausnahme zu diesem Sachverhalt bildet allerdings die Periode der autogenen Eireifung bei *C. p. pipiens*, weil diese Weibchen kurz nach dem Schlüpfen absolut und relativ signifikant mehr Protein und Stickstoff enthalten und schwerer sind als die des anautogenen CF-Stammes, in welchen meistens 1 bis 2 Tage nach Schlüpfen der Residualwert bereits erreicht wird. Die autogenen Weibchen zeigen erst nach der Ablage des ersten Eiflosses dieselbe Periodik im Stoffwechsel. Wenn CLEMENTS (1956) bei Vertretern beider Fortpflanzungstypen gleiche Proteinmengen nach dem Schlüpfen feststellte, so mag dies darauf beruhen, dass er nur histochemische Nachweismethoden verwendet hatte. Wie bereits erörtert (S. 1144), kann hingegen sein anderer Befund mit den vorliegenden Daten vereinbart werden, dass nämlich bei autogenen Weibchen Proteinreserven verbraucht werden für die Eibildung, beispielsweise durch Abbau der ja bis in die frühe Imaginalzeit persistierenden, larvalen Intersegmentalmuskulatur des Abdomens.

Bedeutung des Blutmahls für die Eibildung

Nach unseren Feststellungen verschwinden bei CF-Weibchen bereits 24 Stunden nach Saugakt nahezu 50 Prozent der aufgenommenen Aminosäuren aus dem Darm. Ein ähnliches Verhalten wurde bei CP-Weibchen beobachtet. Bei *Aedes aegypti* ist dies nach 3 Stunden (25°C) der Fall (CLEMENTS, 1963). Nach Angabe von Williams (in CLEMENTS, 1963) findet aber im Mitteldarm von *Aedes aegypti* während

48 Stunden nach Blutaufnahme (25°C) keine Stickstoffabnahme statt, was auf geringe Absorption zurückgeführt wird. Allgemein ist aber wenig bekannt über die Absorption der Verdauungsprodukte (CLEMENTS, 1963). Die Serumproteine werden bei *Culex*-Weibchen wahrscheinlich am ersten Tage verdaut; bei *Aedes aegypti* sind es nach Williams (in CLEMENTS, 1963) zuerst die Globuline und später die Albumine. Ein Hinweis auf die auch bereits begonnene Erythrozytenverdauung ist die relativ hohe Histidinausscheidung am ersten Tag nach Saugakt, weil diese Menge nur aus dem Blutkuchen stammen kann (vergl. Tabellen 3 und 9).

Von dem am ersten Tag abgebauten, beträchtlichen Aminosäurenmaterial ist im 24-stündigen Ovar sehr wenig nachzuweisen (Abb. 8); erst von 24 bis 48 Stunden nach Saugakt entspricht die Zunahme im Ovar der Abnahme im Darm. Auch sind zu dieser Zeit im Darm mehr Aminosäuren in freier Form vorliegend als im Ovar, was damit zusammenhängen könnte, dass die Dotterproteinsynthese nicht nur im Ovar, sondern in Hämolymphe und Fettkörper und Mitteldarmepithel stattfindet (ROTH und PORTER, 1964; CHEN, 1966). Die Ovarien benötigen zu ihrer Reife nur etwa 2/3 der mit dem Wirtsblut in den Darm gelangenden Aminosäuren. Auch ist im gefüllten Darm (0 Stunden) die qualitative Zusammensetzung verschieden von derjenigen des reifen Ovars (72 Stunden): Alanin und Leucin/Isoleucin sind im Darm etwa um 7 Prozent stärker konzentriert als im Ovar, und umgekehrt sind im Ovar die basischen Aminosäuren etwa 7 Prozent stärker vertreten als im Darm.

Die Anzahl der von unseren *Culex*-Weibchen abgelegten Eier ist gut vergleichbar mit anderen Stämmen: bei MÖLLRING (1956) enthielten autogene Gelege 50–100 Eier, anautogene 150–400 Eier pro Weibchen; auch dort blieben anautogene Gelege autogener Weibchen wie bei uns weiterhin kleiner. Autogene Gelege von russischen CP-Weibchen umfassten im Mittel 80 Eier, anautogene 227 (KUPRIYANOVA, 1966). Wird die Zahl der abgelegten Eier bezogen auf das Gewicht des aufgenommenen Blutes, so ergibt sich, dass bei unseren CF pro mg Blut 42 Eier abgegeben werden; bei *Aedes aegypti* sind es etwa 27/mg (ROY, 1936). Dieser Wert ist offensichtlich abhängig vom Wirtsblut, denn mit Menschenblut erhielt WOKE (in CLEMENTS, 1963) bei *C. pipiens* 40/mg, mit Kanarienvogelblut jedoch 82/mg; KUPRIYANOVA (1966) meldet für *C. pipiens* 15/mg, welcher geringer Wert also auf das verwendete Menschenblut zurückzuführen wäre. Vielleicht sind die kernhaltigen Erythrozyten nährreicher als die kernlosen des Säugerblutes (CLEMENTS, 1963).

Beachtenswert ist die zwischen beiden Mückentypen divergierende Zusammensetzung der Ovarproteine im Ruhestadium einerseits und die recht gut konvergierende der reifen Ovarien andererseits (Abb. 6). Es werden also von *C. pipiens*-Weibchen unter verschiedenen Ausgangspunkten bezüglich Reserveproteine und Proteinzusammensetzung nach 72 Stunden Ovarien zur Reife gebracht, welche weitgehend übereinstimmen, ob sie nun autogen oder nach einem Blutmahl sich entwickelten; nur sind die autogenen kleiner. Erstaunlicherweise wird der Reifezustand der Ovarien bei beiden Weibchentypen nach gleicher Zeit erreicht.

Zur Stoffwechselphysiologie einiger Aminosäuren während der Eireifung

Vergleicht man das Verhalten einzelner Aminosäuren, so gibt es zwischen den beiden Mückenstämmen ausser dem Verlauf von Methioninsulfoxid und Taurin und dem Muster der Ovarhydrolysate kaum gravierende Unterschiede, soweit man das bis jetzt erlauben kann.

Die Anreicherung von Methioninsulfoxid in CP-Weibchen wurde schon früher beschrieben und erörtert (Zusammenfassung, CHEN, 1966). Dass diese spezifische Methioninsulfoxid-Zunahme in CP-Weibchen von 7 auf 21 Prozent nur für die autogene Eireifungsperiode zutrifft und nachher nicht mehr, ist neu und erweckt die Vermutung, dass kein direkter Zusammenhang mit der Eireifung besteht. Das ist umso mehr der Fall, als bei CF-Weibchen in den ersten 5 Adulttagen, in welchen ja keine Eireifung statthat, ebenfalls ein geringer Anstieg von 10 auf 17 Prozent beobachtet wird. Zudem ist der Gehalt an Methioninsulfoxid in den reifen Ovarien gleich und relativ gering, verglichen mit demjenigen der Weibchenextrakte.

Charakteristisch ist weiterhin das Verhalten von Taurin (Abb. 5): es ist in den Weibchenextrakten nur nach Blutmahl stärker konzentriert und sonst schwach vertreten. Im Wirtsblut ist wenig Taurin vorhanden, da es nur in den Leucocyten und Thrombocyten stark angehäuft ist (SOUPART, 1962). Es besteht die Möglichkeit, dass Taurin bei der Verdauung aus Cysteinsäure durch Decarboxylierung freigesetzt wird. Tatsächlich konnte dieser enzymatische Schritt bei Tieren gefunden werden (MEISTER, 1965). Da zur Zeit der Eiablage und nach der Verdauung im Extrakt von CF fast kein Taurin mehr gefunden wird, stellt sich die Frage, was damit geschieht. Ausgeschieden wird es nicht. Beim Säugetier findet sich diese Aminosäure in allen Geweben, vorab in Galle, Herz und Urin (MEISTER, 1965). Bei Bakterien konnte die Desaminierung von Taurin zu Isethionsäure nachgewiesen werden (MEISTER, 1965). Von Isethionsäure wird ein Einfluss auf die Reizbarkeit der Nerven angegeben (MEISTER, 1965). Auffallend ist es auch, dass bei CP-Weibchen nach anautogener Eiablage ein hoher Tauringehalt beibehalten wird. Jedenfalls sind weitere Untersuchungen nötig, um die funktionelle Bedeutung des Taurins bei Stechmücken abzuklären.

Auch Histidin wird unmittelbar nach Saugakt massiv freigesetzt und zwar muss es aus dem Blutkuchen stammen, wovon es etwa 10 Prozent ausmacht. Zugleich wird es auch vermehrt ausgeschieden. Bekanntlich ist Hämoglobin reich an Histidin, und menschliche Erythrocyten enthalten zu 35 Prozent Hämoglobin, was 16 Prozent des Gesamtblutes entspricht (LEUTHARDT, 1961). Offenbar wird durch die Verdauung mehr Histidin frei, als in die Dottersynthese eingeht, denn in den ausgereiften Ovarien wurde nur wenig gebundenes Histidin gefunden und freies mit unsern Methoden gar nicht.

Glycin tritt ebenfalls in grösseren Mengen in den Exkreten auf (Tabelle 10). Es hat einen sehr komplexen Metabolismus und kann als Degradationsprodukt der Purine vorkommen; auch am Aufbau der Pyrrolringe des Hämins ist es beteiligt (MEISTER, 1965), womit sein hoher Anteil in den Exkrethydrolysaten hauptsächlich am zweiten Tage der Verdauung in Zusammenhang stehen könnte.

Exkretion

Während der 3 Tage der Eireifung von CF-Weibchen werden nur etwa 1/14 der im vollen Darm nachgewiesenen Aminosäuren in freier oder gebundener Form ausgeschieden. Von anderen blutsaugenden Insekten wurden ähnliche Vorkommnisse beschrieben; bei *Aedes aegypti* sind die Aminosäuren ebenfalls nur schwach an der Exkretion beteiligt (IRREVERRE and TERZIAN, 1959) und bei *Culex* fand diese Arbeitsgruppe viel Arginin, dagegen kein Histidin; es könnte jedoch eine Verwechslung dieser beiden Aminosäuren vorliegen. Bei *Glossina morsitans* wird viel Histidin und Arginin ausgestossen und das Hauptendprodukt des Proteinstoffwechsels ist ebenfalls Harnsäure (BURSELL, 1967). *Rhodnius prolixus* entledigt sich des Stickstoffes zu 80 bis 90 Prozent in Form von Harnsäure (WIGGLESWORTH, 1931) und unter den Aminosäuren überwiegen Histamin und Histidin (HARINGTON, 1961).

Für blutsaugende Insekten ist charakteristisch, dass sie nebst Harnsäure stickstoffreiche Aminosäuren abgeben (BURSELL, 1967). Es wäre zu prüfen, ob bei den Culicinae die Histidindecarboxylase wirklich fehlt, welche offenbar bei *Rhodnius* (Hemiptera) die Histaminausscheidung ermöglicht. Dass die abgegebene Harnsäure ausser vom Purin- auch aus dem Proteinstoffwechsel stammen kann, geht aus Versuchen von TERZIAN *et al.* (1957) hervor, in denen adulte Mückenweibchen auf proteinreicher Nahrung gehalten viel, auf Blutplasma gehalten wenig Harnsäure ausschieden.

Auslösemechanismus der autogenen und anautogenen Eireifung

LEA (1967) zeigte, dass sowohl die Corpora allata als auch die medialen neurosekretorischen Zellen des Protocerebrums für die Eireifung nötig sind, für die autogene wie für die anautogene. Wie wird nun deren Hormonausschüttung ausgelöst? Da die autogene Eireifung immer einsetzt, auch bei Weibchen die aus Hungerzuchten stammen (MÖLLRING, 1956), muss man einen endogenen Auslösemechanismus postulieren. Einfacher zu erklären ist der Stimulus durch ein Blutmahl: die meistens beträchtliche Blutmenge welche beim Saugen direkt in den Mitteldarm fliesst, dehnt das Epithel der Darmwand enorm. Diese Dehnung hat zwei Folgen: das Epithel sezerniert gegen das Darmlumen die peritrophe Membran (FREYVOGEL und STÄUBLI, 1965; FREYVOGEL und JAQUET, 1965). Bei *Aedes aegypti* ist dieser Vorgang abhängig von der Nahrungsmenge, nicht aber bei *Anopheles stephensi*. Bei *Aedes* (SHAMBAUGH, 1954) und *Glossina* (LANGLEY, 1966) ist auch die Proteasenaktivität des Darmes proportional der aufgenommenen Blutmenge, also abhängig von der Dehnung. Diese Befunde untermauern die Bedeutung des gedehnten Darmepithels.

Die zweite Folge der Dehnung des Mitteldarmepithels besteht darin, dass ein Stimulus auf das endokrine System wirkt. Dafür sprechen Befunde an *Glossina morsitans* (LANGLEY, 1967), wonach die proteolytische Enzymaktivität des Mitteldarmes auch einer neurosekretorischen Kontrolle durch das stomatogastrische Nervensystem untersteht. So erfüllt das aufgesogene Blut offenbar zwei Aufgaben: es stellt den anautogenen Mückenweibchen einerseits die Proteine zur Verfügung

und stimuliert andererseits via Nervensystem die Synthese der Dotterproteine. Bei autogenen Bedingungen ist nur der letztere Vorgang verwirklicht, der hier auf rein endogenen, hormonalen Vorgängen beruht.

Zusammenfassung—Die frisch geschlüpften, autogenen Weibchen von *Culex pipiens pipiens* L. sind bei gleicher Larvenernährung gesichert schwerer, verfügen über die doppelte Proteinmenge und weisen einen wesentlich höheren Totalstickstoffgehalt auf als die gleich alten anautogenen Weibchen von *Culex pipiens fatigans* Wiedem.

Nach jedem Gonozyklus sinken die gemessenen Grössen der beiden Mückentypen auf die gleichen Residualwerte (2,5 mg Frischgewicht, 50 µg Stickstoff und 0,1 mg Protein pro Weibchen). Mit jeder vollständigen Blutaufnahme werden diese minimalen Werte sprunghaft um das Zwei- bis Vierfache erhöht. Zu dieser physiologischen Periodik geht parallel eine morphologische einher, die sich in der Volumenänderung der Follikel ausdrückt.

In 72-stündigen, ablegebereiten Ovarien ist die absolute Proteinmenge nach autogener Reifung gesichert geringer als nach anautogener; die relative Proteinmenge (pro Frischgewicht des Ovars) ist in beiden Fällen jedoch dieselbe. Bei anautogenen, legebereiten Weibchen ist der Proteingehalt im Körper gleich wie im Ovar; dagegen bei Weibchen nach autogener Eireifung ist dieser im Körper nur halb so gross wie im Ovar. Es werden also bei der autogenen Eireifung von *C. pipiens* die Dotterproteine auf Kosten des mütterlichen Organismus aufgebaut, indem dessen larvale Proteinreserven verbraucht werden.

Messungen von Ovarhydrolysaten ergeben, dass die Dotterproteine bei den beiden Reifungsprozessen verschieden schnell eingebaut werden: bei autogenen Weibchen liegt das Einbauparallel zwischen 48 und 72 Stunden und bei anautogenen bereits zwischen 24 und 48 Stunden. Zu den gleichen Zeiten findet auch die maximale Volumenzunahme der Follikel statt. Die prozentuale Aminosäurezusammensetzung der Ovarproteine im Ruhestadium ist zwischen den beiden Typen sehr verschieden und zeigt im ausgereiften Zustand der Ovarien eine weitgehende Übereinstimmung.

Die freien Aminosäuren in *Culex*-Weibchen zeigen eine Abnahme zur Zeit der autogenen Dotterbildung und eine Zunahme mit fortschreitender Verdauung von Blut. Allgemein sind Alanin, Glutamin, Methioninsulfoxid und Histidin am konzentriertesten, indem diese je 30–5 Prozent aller freien ausmachen. Ausser Taurin und Methioninsulfoxid unterscheiden sich die freien Aminosäuren in ihrem Verlaufe nicht stark zwischen den beiden Mückenstämmen.

In vier Intervallen nach Blutaufnahme wurde der Inhalt des Mitteldarmes verfolgt: das Verhältnis der freien Aminosäuren zu denjenigen der Hydrolysate wächst in 3 Tagen von 0,9 Prozent auf 19,4 Prozent. Innerhalb des ersten Tages wird bereits die Hälfte des Darminhaltes abgebaut; mit 72 bis 96 Stunden, d.h. zur Zeit der Eiablage, ist die Verdauung meist beendet.

In den Exkreten nach Blutmahl bildet bei beiden Mückentypen die Harnsäure etwa 30 Prozent des Trockengewichtes. An der Stickstoffausscheidung macht Harnsäure 64 Prozent aus, der Aminostickstoff 16 Prozent; die restlichen 20 Prozent werden in anderer Form ausgeschieden. Die Aminosäuren wurden in vier Intervallen untersucht: die Relation freier zu gebundenen ist meist 1 : 1; ihr Muster bei beiden Mücken sehr ähnlich. Unter den freien Aminosäuren ist Histidin am ersten Tag mit 80 Prozent vertreten; von den gebundenen ist Glycin die Hauptkomponente und umfasst am zweiten Tag 60 Prozent. Histamin und Taurin fehlen. Die Ausscheidungsmaxima von Harnsäure und Aminosäuren fallen in die Zeit der intensivsten anautogenen Dottersynthese, 24 zu 48 Stunden nach Saugakt.

Von den im Blut aufgenommenen Aminosäuren werden bei *C. p. fatigans* etwa 2/3 zur Eiproduktion verwendet (42 Eier/mg Blut) und 1/3 ist als überflüssig zu betrachten. Die Proteinreserven der autogenen Weibchen sind nur etwa halb so gross wie die später mit Blut zugeführten; sie sind aber genügend, um eine Eireifung zu ermöglichen.

Die Bedeutung der vorliegenden Befunde für die Autogenie bei Stechmücken wird diskutiert.

Anerkennung—Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. S. CHEN, bin ich für die Überlassung des Themas und die Leitung dieser Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

LITERATUR

- BOELL E. J. und SHEN S. C. (1954) An improved ultramicro Kjeldahl technique. *Exp. Cell Res.* **7**, 147–152.
- BURSELL E. (1965) Nitrogenous waste products of the tsetse fly, *Glossina morsitans*. *J. Insect Physiol.* **11**, 993–1001.
- BURSELL E. (1967) The excretion of nitrogen in insects. *Adv. Insect Physiol.* **4**, 33–67.
- CHEN P. S. (1958) Studies on the protein metabolism of *Culex pipiens* L.—I. Metabolic changes of free amino acids during larval and pupal development. *J. Insect Physiol.* **2**, 38–51.
- CHEN P. S. (1959) Studies on the protein metabolism of *Culex pipiens* L.—III. A comparative analysis of the protein contents of the larval haemolymph of autogenous and anautogenous forms. *J. Insect Physiol.* **3**, 335–344.
- CHEN P. S. (1966) Amino acid and protein metabolism in insect development. *Adv. Insect Physiol.* **3**, 53–132.
- CHEN P. S. und BRIEGEL H. (1965) Studies on the protein metabolism of *Culex pipiens* L.—V. Changes in free amino acids and peptides during embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 463–473.
- CHEN P. S., HANIMANN F., und BRIEGEL H. (1967) Freie Aminosäuren und Derivate in Eiern von *Drosophila*, *Culex* und *Phormia*. *Rev. Suisse Zool.* **74**, 570–589.
- CLEMENTS A. N. (1956) Hormonal control of ovary development in mosquitoes. *J. exp. Biol.* **33**, 211–223.
- CLEMENTS A. N. (1963) *The Physiology of Mosquitoes*. Pergamon Press, Oxford.
- CLOTTEN R. und CLOTTEN A. (1962) *Hochspannungselektrophorese*. Georg Thieme, Stuttgart.
- FISK F. W. und SHAMBAUGH G. F. (1952) Protease activity in adult *Aedes aegypti* mosquitoes as related to feeding. *Ohio J. Sci.* **52**, 80–88.
- FREYVOGEL T. A. und JAQUET C. (1965) The prerequisites for the formation of a peritrophic membrane in Culicidae females. *Acta trop.* **22**, 148–154.
- FREYVOGEL T. A. und STÄUBLI W. (1965) The formation of the peritrophic membrane in Culicidae. *Acta trop.* **22**, 118–147.
- GEIGER H. R. (1961) Untersuchungen über freie Aminosäuren während der Adultentwicklung von *Culex pipiens* und *Culex fatigans* und deren Einfluss auf die Eireifung. *Rev. Suisse Zool.* **68**, 583–626.
- GILMOUR D. (1965) *The Metabolism of Insects*. Oliver & Boyd, London.
- HARINGTON J. S. (1961) Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus*—II. Analysis of the excretory material. *Parasitology* **51**, 319–326.
- IRREVERRE F. und TERZIAN L. A. (1959) Nitrogen partition in excreta of three species of mosquitoes. *Science, N.Y.* **129**, 1358–1359.
- KHAN M. A. (1963) Untersuchungen über die Vererbung der Autogenie im *Culex pipiens*-Komplex mit Hilfe von Markiergenen. Dissertation, Mainz.
- KUPRIYANOVA E. S. (1966) On the gonotrophic cycle in mosquitoes of the genus *Culex*—I. The influence of the quantity of human blood taken on the development of the eggs and the fecundity in *Culex pipiens molestus* Forsk. and *Culex pipiens pipiens* L. *Medskaya Parazit.* **35**, 310–316.
- LANGLEY P. A. (1966) The control of digestion in the tsetse fly, *Glossina morsitans*: Enzyme activity in relation to the size and nature of the meal. *J. Insect Physiol.* **12**, 439–448.
- LANGLEY P. A. (1967) The control of digestion in the tsetse fly, *Glossina morsitans*: A comparison between field flies and flies reared in captivity. *J. Insect Physiol.* **13**, 477–486.

- LAVEN H. (1957) Vererbung durch Kerngene und das Problem der ausserkaryotischen Vererbung bei *Culex pipiens*—II. Ausserkaryotische Vererbung. *Z. indukt. Abstamm.-u. VererbLehre* **88**, 478–516.
- LAVEN H. (1967) Speciation and evolution in *Culex pipiens*. In *Genetics of Insect Vectors of Disease* (Ed. by WRIGHT J. W. and PAL R.), pp. 251–275. Elsevier, Amsterdam.
- LEA A. O. (1963) Some relationships between environment, corpora allata, and egg maturation in aedine mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **9**, 793–809.
- LEA A. O. (1964) Studies on the dietary and endocrine regulation of autogenous reproduction in *Aedes taeniorhynchus* Wied. *J. med. Ent.* **1**, 40–44.
- LEA A. O. (1967) The medial neurosecretory cells and egg maturation in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **13**, 419–429.
- LEA A. O., DIMOND J. B., and DELONG D. M. (1956) Role of diet in egg development by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Science, N.Y.* **123**, 890–891.
- LEA A. O., DIMOND J. B., and DELONG D. M. (1958) Some nutritional factors in egg production by *Aedes aegypti*. *Proc. 10th int. Congr. Ent.* (1956) **3**, 793–796.
- LEUTHARDT F. (1961) *Lehrbuch der physiologischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin.
- MATTINGLY P. F., ROZEBOOM L. E., KNIGHT K. L., LAVEN H., DRUMMOND S. R., CHRISTOPHERS S. R., and SHUTE P. G. (1951) The *Culex pipiens* complex. *Trans. R. ent. Soc. Lond.* **102**, 331–382.
- MEISTER A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids*. Academic Press, London.
- MÖLLRING F. K. (1956) Autogene und anautogene Eibildung bei *Culex* L. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Unterscheidung autogener und anautogener Weibchen an Hand von Eiröhrenzahl und Flügellänge. *Z. Tropenmed. Parasit.* **7**, 15–48.
- PRAETORIUS E. (1962) Harnsäure. In *Methoden der enzymatischen Analyse* (Ed. BERGMAYER, H. U.), S. 500–501. Verlag Chemie, Weinheim.
- ROTH T. F. and PORTER K. R. (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *J. Cell Biol.* **20**, 313–332.
- ROY D. N. (1936) On the role of blood in ovulation in *Aedes aegypti* L. *Bull. ent. Res.* **27**, 423–429.
- SHAMBAUGH G. F. (1954) Protease stimulation by food in adult *Aedes aegypti* L. *Ohio J. Sci.* **54**, 151–160.
- SOUPART P. (1962) Free amino acids of blood and urine in the human. In *Amino Acid Pools* (Ed. by HOLDEN J. T.), pp. 220–262. Elsevier, Amsterdam.
- STONE A., KNIGHT K. L. and STARCKE H. (1959) *A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World*. Thomas Say Foundation. Vol. 6, Entomological Society of America.
- TERZIAN L. A., IRREVERRE F., and STAHLER N. (1957) A study of nitrogen and uric acid patterns in the excreta and body tissues of adult *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **1**, 221–228.
- VAN DER WAERDEN B. L. und NIEVERGELT E. (1956) *Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels X-Test und Zeichentest*. Springer, Berlin.
- VAN HANDEL E. und LUM P. T. (1961) Sex as regulator of triglyceride metabolism in the mosquito. *Science, N.Y.* **134**, 1979–1980.
- WEYER F. (1934) Der Einfluss der Larvalernährung auf die Fortpflanzungsphysiologie verschiedener Stechmücken. *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.* **38**, 394–398.
- WIGGLESWORTH V. B. (1931) The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)—I–III. *J. exp. Biol.* **8**, 411–451.
- WIGGLESWORTH V. B. (1943) The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc. R. Soc. (B)* **131**, 313–339.

Reprinted from *Journal of Insect Physiology*, Vol. 15, No. 7, pp. 1137-1166